

African food tradition revisited by research

Project coordinator : Cirad
www.after-fp7.eu





African Food Tradition rEvisited by Research
FP7 n°245025

Start date of project: **01/09/2010**
Duration: **45 months**

Deliverable number: D.1.2.3.12

Title of deliverable: **SOP for biochemical and nutritional analysis for Group 2**

Deliverable type (Report, Prototype, Demonstration, Other): Report

Dissemination level (PU, PP, RE, CO)*: PU

Contractual date of delivery: February 2011

Actual date of delivery: October 2011

Work-package contributing to the deliverable: WP1

Organisation name of lead contractor for this deliverable: ADIV

Authors: are indicated on the appropriate SOPs.

This document has been send to:

The coordinator by WP Leader	Date: September 2011
To the Commission by the Coordinator	Date: October 2011

* PU: Public; PP: Restricted to other programme participants (including the Commission Services); RE: Restricted to a group specified by the consortium (including the Commission Services); CO: Confidential, only for members of the consortium (including the Commission Services)

Methodology for the development of SOPs for this deliverable.

This deliverable consists of several SOPs. SOPs related to biochemical and nutritional analysis for one Group of product.

The SOP's come from four sources:

1. The literature by searching the analysis method for similar components we want to determine in the African fermented and functional products. In this case several articles are combined according to their precisions.

2. Standards from the international Organization Standardization (ISO) or AACC the International Approved methods. In this case, the method is used like that or after minor modifications. And the modifications are then precised in the document, with the ISO or AACC joined in the annex. To be in agreement with intellectual property rules the project coordination purchased and distributed to partners all the standards referenced in SOP

3. The SOP's can come from the laboratory that developed the methods for the specific analysis.

4. Case of the kit enzymatic method developed by the vendors of the kit materials.

After writing, the SOP's are approved by the Work Package Leader (WPL) related to the group of product concerned (Group 1: WP2; Group 2: WP3; Group 3: WP4).

The WPL is in charge to send the SOP's to the concerned partners for validation. Each partner, according to his laboratory facilities, validates the method and informs one of the following alternatives in his laboratory:

R - The laboratory makes the analysis in routine (= R codification in the table joined)
P - The laboratory is able to make this analysis (= possible P)
B - The laboratory can make the analysis after buying equipment (= B)
I - The laboratory can't make the analysis (I= impossible or sub-contracting).

The WPL decides the end of the validation step. He accepts the final SOP version. He completes the table with the last revision date.

D1.2.3.12 - SOPs for Biochemical and nutritional analysis for Group 2

Characteristics	Compounds	Method	Principle	N° SOP
Nutrional factors	Protein	NF V 04407	Minéralisation par chauffage avec l'acide sulfurique concentré en présence d'un catalyseur, Alcalinisation, distillation de l'ammoniac libéré qui, recueilli dans une solution d'acide borique, est titré par une solution d'acide sulfurique. - Détermination de la teneur en azote, calcul de la teneur en protéines en multipliant par le facteur conventionnel de 6,25.	Nutri-MeatFish-001-fr
	Lipid	Folch method (-Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H.S., J.Biol.Chem., 1957, 226, 497-509)	Extraction au chloroforme / méthanol, lavage à l'eau salée	Nutri-MeatFish-002-fr
Anti-nutrional factors	Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH)	Méthode CIRAD	HPLC	Anti-Nutri-MeatFish-001-fr

	TBARS	Méthode interne ADIV	Les produits d'oxydation secondaire des huiles et graisses font réaction avec l'acide 2-thiobarbiturique, formant des produits de condensation. L'absorbance de ceux-ci est mesurée à 530 nm ,correspondant à l' absorption maximum	Anti-Nutri-MeatFish-002-fr
	ABVT	Ababouch L.H., 1995. Assurance qualité en industrie halieutique. Manuels Scientifiques et Techniques, Ed. Actes, pp72-91.	Après déprotéinisation de l'échantillon à l'acide perchlorique, on procède à la distillation de l'ABVT à la vapeur, puis à sa neutralisation par l'acide chlorhydrique	Anti-Nutri-MeatFish-003-fr
	Amines biogènes (histamine, cadaverine, putrescine)	Ababouch (1995)	Après extraction des amines biogènes (histamine, cadaverine, putrescine) par une solution d'acide trichloracétique, on procède à leur dérivation par l'O-phtalaldéhyde (OPA) et on sépare par chromatographie liquide à phase inversée, détecteur à fluorescence	Anti-Nutri-MeatFish-004-fr
Sampling preparation before analysis		méthode simplifiée	variante de la NF V 04 416	Prep-MeatFish-001-fr

	**African Food Tradition rEvisited by Research** **FP7 n°245025**	

Deliverable D.1.2.3.12 : SOP for biochemical and nutritional analysis for Group 2

Procédure de dosage de l'azote total par la méthode Kjeldhal et calcul de la teneur en protéines

SOP Number: **Nutri-MeatFish-001-fr**

Date of creation: 16/05/2011	Revision:

Written by : Valérie SCISLOWSKI (ADIV)

For information on this SOP please contact :

- Valérie SCISLOWSKI (valerie.scislowski@adiv.fr)

This document has been approved by :

Partner	Name of the person who approved	Date DD/MM/YY
CIRAD UAC CSIR ADIV UT INRA	Valérie SCISLOWSKI	16/05/2011

Table des matières

1 DOMAINE ET APPLICATION

Ce mode opératoire a pour objet de formaliser la méthode de dosage de l'azote total selon la méthode Kjeldhal pour calculer la teneur en protéines des produits carnés.
Cette analyse est accréditée selon la norme NF V 04.407.

2 REFERENCES

Cette analyse est décrite dans divers documents normatifs (Norme ISO 17025, Norme AFNOR NF V 04-407, NF EN ISO 04-416, NF EN ISO 3696) et sa description est largement tombé dans le domaine de la littérature publique.

3 DEFINITIONS

La méthode de Kjeldahl est applicable pour le dosage de l'azote de différents composés azotés tels les amines et les sels d'ammonium quaternaires. Elle ne permet pas le dosage direct des nitrates, nitrites, nitrosyles, cyanures qu'il faut d'abord réduire en ammoniac.

4 PRINCIPE

La détermination des protéines par la méthode Kjeldahl s'effectue en trois étapes :

- Minéralisation du produit par chauffage avec de l'acide sulfurique concentré en présence d'un catalyseur,
- Alcalinisation des produits de la réaction, distillation de l'ammoniac libéré qui, recueilli dans une solution d'acide borique, est titré par une solution d'acide sulfurique.
- Détermination de la teneur en azote, calcul de la teneur en protéines en multipliant par le facteur conventionnel de 6,25.

5 REACTIFS

- catalyseur de minéralisation, en pastilles (5 g K_2SO_4, 0,15 g $CuSO_4$ – 5 H_2O-0,15 g Ti O_2).
- billes de verre (éventuellement),
- acide sulfurique (d = 1,84 g/ml),
- eau oxygénée 20 volumes,
- acide borique 4 %,
- lessive de soude à 32 %,
- solutions d'indicateurs :
  - bleu de méthylène à 0,1 % et rouge de méthyl à 0,2 % dans éthanol 96 %
  - ou vert de bromocrésol 0,2 %(solution A) et rouge de méthyl 0,2 % dans éthanol (solution B) : l'indicateur est composé de 5 volumes de et de un volume B.
- HCl N (Normalité exacte),
- HCl 0,1 N, (normalité exacte 0,001 N près)
- sulfate d'ammonium de pureté connue ; conserver à l'abri de l'humidité ou sécher en étuve 2 h à 104 ± 3°C
- tryptophane de pureté connue ; conserver à l'abri de l'humidité ou sécher en étuve 2 h à 104 ± 3°C
- eau distillée,
- papier à peser ou nacelle de pesée

6 APPAREILLAGE

- balance analytique au mg,
- digesteur type Büchi 435,
- distillateur,
- auxiliaire de pipetage,

- pipettes 20 ml et 5 ml,
- pipette de 50 ml jaugée,
- burette de 25 ml précise à 0,05 ml,
- ballons ou Erlen Meyer de 250 ml,
- tubes en verre du digesteur et du distillateur,
- éprouvette de 50 ml,
- flacons en plastique ou en verre étanche à bouchon vissé,
- fioles de 100 ml, 500 ml et 2 000 ml,
- paniers ou portoirs métalliques pour tubes à digestion et distillation,
- distributeur automatique (type Optifix) réglé à 25 ml,
- agitateur magnétique et barreau,
- pissette 1 000 ml,
- spatule.

7 PROCEDURE

7.1 Prise d'essai

- tarer 1 tube du digesteur identifié sur la balance,
- peser entre 0,5 et 2 g de l'échantillon broyé (le disposer dans le fond du tube).

Noter la masse.

*pour les produits riches en viande (ex : saucissons), prélever 1 g,
*pour les produits pauvres en viande (ex : lasagne, farce, plats préparés), prélever 1,5 g,

Remarque : Par rapport à la teneur présumée en azote du produit, il est possible d'adapter la prise d'essai.

7.2 Minéralisation

7.2.1 Préparation

Ajouter dans le tube de digesteur :

- Un comprimé de catalyseur
- 12,5 ml d'acide sulfurique avec 1 auxiliaire de pipetage,
- 2,5 ml d'H_2O_2 avec 1 auxiliaire de pipetage.

Remarque : Pour les produits très gras, mettre 15 ml d’acide sulfurique en raison de l’évaporation.

7.2.2 Digestion

Voir le mode opératoire du digesteur.

- Placer les tubes dans le digesteur,
- préchauffer au thermostat 2 - 3,
- chauffer fortement au thermostat 8,
- quand la solution est devenue limpide, continuer l’ébullition pendant 2 heures. Arrêter la minéralisation en amenant le thermostat à 0,
- laisser refroidir les tubes et les regrouper dans un panier métallique.

Remarques :

- *la régulation de la puissance de chauffe varie, selon le type d'échantillon (pour les produits gras, il est nécessaire de chauffer plus doucement et pendant un temps plus long),*
- *ne pas surchauffer : on risquerait de provoquer une perte d'azote avec la vapeur acide,*
- *en cas de cristallisation, recommencer l’analyse.*

7.2.3 Distillation

- Préparer les erlens :
  - Les identifier par le numéro de référence,
  - Ajouter 25 ml d'acide borique à 4 %,
  - Ajouter 4 gouttes d'indicateur coloré.

Voir le mode d'emploi du distillateur

- mettre l'appareil sous tension et l'alimenter en eau,

- Passer un tube de digestion vide et un ballon vide afin de vérifier le bon fonctionnement de l'appareil.
- Passer 1 témoin négatif :

  Utiliser 1 tube de digestion contenant ≈ 50 ml d'eau distillée et récupérer le distillat dans un ballon identifié. Ce distillat est ensuite utilisé pour évaluer le "blanc de la distillation".
- Conduite de la distillation :
  - Dans le tube de digestion refroidi, ajouter avec précaution environ 50 ml d'eau distillée ; agiter par rotation et laisser refroidir,
  - disposer le tube de digestion dans le distillateur,
  - ajouter 45 ml de NaOH dans l'erlen (levier du distillateur, l'alimenter si nécessaire),
  - poursuivre chaque distillation pendant 7 mn environ (obtenir au moins 200 ml de distillat).
  - Rincer l'embout par lequel arrive le distillat après chaque utilisation en recueillant les eaux de rinçage dans l'erlen de l'analyse en cours.

7.2.4 Titrage

- Titrer les échantillons et le témoin négatif après la distillation,
- il convient d'effectuer le titrage aussi rapidement que possible une fois la distillation terminée,
- Titrer à l'aide de l'HCl 0,1 N (utiliser une burette de 25 ml),
- Remplir la burette d'HCl,
- Arrêter l'écoulement quand l'indicateur devient rose-violet (passage de la base à l'acide),
- Noter le résultat du dosage sur le document de suivi de l'analyse (indiquer le résultat à 2 chiffres après la virgule),
- Nettoyer la burette quand les titrages sont terminés (la rincer à l'eau distillée).

8 EXPRESSION DES RESULTATS

8.1 Méthode de calcul et formule

- La teneur en azote total exprimée en pourcentage en masse est égale à :

$$\textbf{\% d'azote} = \frac{(V1 - V0) \times T \times 14 \times 100}{m \times 1000} = \frac{(V1 - V0) \text{ x T x } 1{,}4}{m}$$

  % protéines = % Azote X 6,25,

  V_0 = Volume de la solution d'HCl 0,1 N utilisé pour l'essai à blanc, en millilitres

  V_1 = Volume de la solution d'HCl 0,1 N utilisé pour l'échantillon, en millilitres

  m = Masse de la prise d'essai en g

  T= Titre de l'acide en Normalité

- Calculer le % en masse de protéines dans l'échantillon :

  % Prot = % Azote X 6,25

  Coefficient de la masse molaire de l'azote = 14,

  6,25 = coefficient de conversion de N en protéines animales.

- Exprimer le pourcentage d'azote avec 2 décimales vraies. Si le troisième chiffre est inférieur à 5, le chiffre précédent n'est pas modifié. Si le troisième chiffre est supérieur ou égal à 5, le chiffre précédent est augmenté d'une unité.
- Exprimer le pourcentage de protéines avec 1 décimale.

8.2 Répétabilité

9 POINTS CRITIQUES OU NOTE SUR LA PROCEDURE

- qualité du broyage et homogénéisation de l'échantillon : se reporter à la SOP 'Prep-MeatFish-001-fr »
- respect du temps de minéralisation
- appréciation de la zone de virage

- **Les réactifs :** les produits chimiques doivent être de qualité analytique

Si ces conditions sont respectées, l'influence des réactifs et consommables peuvent être considérées comme négligeable. L'acide chlorhydrique est acheté, prêt à l'emploi, avec une normalité garantie. A chaque nouveau lot de réactifs utilisé pour la minéralisation, un essai à blanc est effectué.

- **L'échantillon**

La prise d'essais s'effectue sur un broyat initialement préparé dont l'homogénéité est assurée par la qualification et l'habilitation des techniciennes.

- **Le Minéralisateur**

L'influence est insignifiante si le mode opératoire est bien observé. D'autre part, un contrôle de rendement (tryptophane) est réalisé au minimum 2 fois par mois afin de s'assurer de son bon fonctionnement.

- **Le Distillateur**

L'influence est insignifiante si le mode opératoire est bien observé. D'autre part, un contrôle de rendement (tryptophane ou sulfate d'ammonium) est réalisé par semaine.

- **Les Tubes de distillation**

Ils doivent être de bonne qualité et en bon état afin d'éviter les éventuelles fuites.

10 RAPPORT D’ANALYSE

Indiquer pour le document de suivi de l'analyse :

- le nom de l’échantillon en précisant sa nomenclature et le type d’échantillon
- la date de l’analyse et le nom de l’opérateur
- la méthode utilisée (ici SOP N° Nutri-MeatFish-001-fr)
- toutes observations relatives à l’état de l’échantillon si celui-ci était ou paraissait suspect avant analyse
- la masse de la prise d'essai,
- le résultat du titrage (V1),
- le résultat final,
- la valeur de titrage du témoin négatif (V0),
- la valeur des témoins.
- toutes observations relatives au déroulement de la méthode si son application venait à être problématique

11 ENREGISTREMENT DES REEISIONS

Date	**Responsible person**	**Description of change**

12 ANNEXE

<table>
<tr><td></td><td><u>African Food Tradition rEvisited by Research</u>
<u>FP7 n°245025</u></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="3">Deliverable D.1.2.3.12 : SOP for biochemical and nutritional analysis for Group 2</td></tr>
<tr><td colspan="3">Procédure de dosage des lipides totaux par la méthode de Folch</td></tr>
<tr><td colspan="3">SOP Number: Nutri-MeatFish-002-fr</td></tr>
<tr><td colspan="2">Date of creation: 16/05/2011</td><td>Revision: 31/8/2011</td></tr>
<tr><td colspan="3">Written by : Valérie SCISLOWSKI (ADIV)

For information on this SOP please contact :
Valérie SCISLOWSKI (valerie.scislowski@adiv.fr)</td></tr>
<tr><td colspan="3">This document has been approved by :</td></tr>
</table>

Partner	Name of the person who approved	Date DD/MM/YY
CIRAD UAC CSIR ADIV UT INRA	Valérie SCISLOWSKI	16/05/2011

Table des matières

1 DOMAINE ET APPLICATION

Ce mode opératoire décrit comment déterminer la teneur en lipides totaux des tissus animaux selon la méthode décrite par Folch et al (1957). Elle s'applique à tous types de tissus animaux dont les muscles, le gras, les abats.

2 REFERENCES

Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H.S. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226, 497-509.

3 DEFINITIONS

4 PRINCIPE

L'échantillon est traité par un mélange Folch constitué de deux solvants : chloroforme ($CHCl_3$) et méthanol (CH_3OH) (2vol/1vol). Le méthanol est utilisé pour rompre les liaisons lipides-protéines, alors que le chloroforme solubilise les lipides.

Les substances non lipidiques solubles dans le mélange sont éliminées en lavant l'extrait avec de l'eau salée. Le sel diminue la dissociation des lipides acides, ces derniers restent sous forme non dissociée dans la phase solvant (chloroforme). De plus, la présence d'eau salée, bien miscible dans le méthanol, permet de séparer la phase chloroformique (phase inférieure) contenant les lipides de la phase méthanolique (phase supérieure) contenant les produits hydrophiles (glucides, protéines). Les lipides totaux sont ensuite récupérés après évaporation du chloroforme. La teneur est déterminée après pesée des lipides à secs.

5 REACTIFS

- Chloroforme technique (distillé au labo)
- Méthanol RP (CH_3OH)

- Hyflosupercel (Silice extraite de diatomés)
- Chlorure de sodium
- Nonadecanoic acid

6 APPAREILLAGE

- Broyeur type ultraturax
- Pot de broyeur verre type MSE ou Virtis volume 50ml
- 3 éprouvettes graduées de 1 litre
- 1 éprouvette graduée de 500ml
- 1 éprouvette graduée de 250ml
- 2 éprouvettes graduées de 50ml
- Ampoule à décanter forme sphérique 250ml (1 / ech)
- Ampoule à décanter forme sphérique 500ml (1 / ech)
- Entonnoir en verre (1 / ech)
- Entonnoir à poudre (1 / ech)
- Entonnoir filtrant cylindrique (verre fritté porosité N°2) diamètre 65mm contenance 125ml (1 / ech)
- Fioles à vide 250ml (1 / ech)
- Pierre ponce
- Filtre séparateur de phase 1SP Sartorius (disque 150mm de diamètre) grade 480
- Joint conique en caoutchouc
- Coupelle en aluminium
- Dessiccateur en verre
- Pissette plastique
- Pipette pasteur en verre
- Poire en caoutchouc
- Potences

- Spatules
- Ballons rodés fond plat de 250ml (1 / ech)
- Evaporateur rotatif

7 PROCEDURE

L'échantillon de tissu prélevé est préparé selon la SOP « Prep-MeatFish-001-fr ». L'échantillon ainsi rendu homogène est conservé à -20°C.

7.1 Préparation des solutions

1 - Solution de Folch (mélange chloroforme/méthanol 2volumes/1volume) : 600 ml $CHCl_3$ + 300 ml CH_3OH

2 - Solution aqueuse de NaCl à 0,73% : 7,3 g de NaCl, complété à 1L avec de l'H_2O distillée

3 - Solution aqueuse de NaCl à 0,58% : 5,8 g de NaCl complété à 1L avec de l'H_2O distillée.

4 - Solutions de rinçage des phases : mélanger $CHCl_3$-CH_3OH-H_2O salée à 0,58% (vol/vol/vol) dans les proportions 8/4/3. Après agitation et repos (1 nuit dans une ampoule à décanter de 2l), le mélange se sépare en deux phases (Phase supérieure PS, Phase inférieure PI) qui sont chacune conservées à température ambiante en bouteille hermétique de 1l.

5 – Filtre séparateur de phase (1SP) doivent être délipidé : mettre le nombre de filtre à utiliser dans un plateau recouvert de chloroforme pendant 24h.

7.2 Protocole

1 - Peser précisément environ Xg d'échantillon (voir tableau ci-dessous) dans le pot de broyeur sur une balance de précision de classe A dont la résolution (affichage) minimale est de 0,1mg.

Tissus	**Prise d'essai**
Muscle	4g
Tissu adipeux	0,05g

2 - Mesurer 150 mL de mélange Folch dans une éprouvette graduée. Verser le volume dans une ampoule à décanter de 250 ml et marquer au feutre le volume. Remettre le liquide dans l'éprouvette. (Cette étape sert à marquer le volume sur l'ampoule et à vérifier l'absence de fuites de l'ampoule à décanter au niveau du robinet).

3 – A température ambiante, ajouter environ 45 ml de Folch dans le pot de broyeur et l'équivalant d'une spatule d'hyflosupercel (poudre abrasive de diatomée facilitant l'extraction des lipides).

4 - Broyer 3 fois une minute à 18 000 tours/min en laissant reposer 1 à 2 minutes entre chaque broyage.

5 - Filtrer l'homogénat sur un entonnoir muni d'un verre fritté de porosité N°2 (recouvert d'une fine couche d'hyflosupercel) placé sur une fiole à vide de 250ml branchée sous vide.

6 – Après complète filtration, récupérer le résidu du filtre et le réintroduire dans le pot de broyeur, extraire 2 fois supplémentaires de la même façon sans ajouter d'hydrosupercel, rincer le pot du broyeur et le verre fritté avec 5 à 10ml de mélange Folch qui sera ajouté au filtrat.

7 - Verser les 3 filtrats récupérés dans une ampoule à décanter de 250 ml et compléter à 150 ml (suivant la marque du feutre) avec le mélange de Folch.

8 - Ajouter 37 ml de solution NaCl à 0,73%. Agiter fortement et laisser reposer une nuit à température ambiante.

9 – Après équilibration complète des phases, soutirer la phase inférieure (PI) qui contient les lipides dans un ballon de 250ml + pierre ponce préalablement taré muni d'un entonnoir contenant un filtre séparateur de phase (1SP) délipidé (24h dans du chloroforme).

10 – Ajouter dans l'ampoule (contenant seulement la phase supérieure) 30 ml de PI préparée la veille (chloroforme/méthanol/eau salée à 0,58% (8/4/3 (vol/vol/vol)). Agiter vigoureusement puis laisser les phases se rééquilibrer (environ 1h) ; soutirer la phase inférieure (contenant les lipides) dans le même ballon qu'au point 9.

11 - Evaporer le solvant à l'évaporateur rotatif sous vide et à une température inférieure à 40°C.

12 - Effectuer une 1ère évaporation

13 - Resolubiliser les lipides avec 10ml de mélange de Folch

14 - Reévaporer à sec et prolonger l'évaporation 10min supplémentaire afin de s'assurer d'être débarrassé des dernières traces de solvants.

15 - Peser (balance au 1/10mg) jusqu'à obtenir un poids constant (reprendre l'évaporation si nécessaire) et noter la valeur.

Remarque : Les lipides totaux présents à l'état sec dans le ballon sont remis en solution avec un volume fixe (fiole jaugée) de chloroforme afin d'éviter toute dénaturation pendant sa conservation ultérieure au congélateur à -20°C.

8 EXPRESSION DES RESULTATS

8.1 Méthode de calcul et formule

Teneur en lipides totaux (en g/100g de viande) = (Y-X) x 1000 / m

Avec :

m : masse initiale de la prise d'essai d'échantillon

Y : masse des lipides pesés + tare du ballon de 250 mL

X : tare du ballon de 250 mL

100 : facteur de conversion pour une expression des lipides totaux en g pour 100 g de produit

8.2 Répétabilité

9 POINTS CRITIQUES OU NOTE SUR LA PROCEDURE

- La préparation de l'échantillon doit être de qualité afin que la pesée initiale soit réalisée sur un produit homogène.
- L'évaporation finale du solvant avant pesée des lipides extraits doit être totale. Renouveler les opérations d'évaporation tant que le poids constant n'est pas atteint.
- Lors de l'étape finale d'évaporation des solvants, bien surveiller le système afin que les lipides ne soient pas aspirés par le vide.

10 RAPPORT D'ANALYSE

Indiquer pour le document de suivi de l'analyse :

- le nom de l'échantillon en précisant sa nomenclature et le type d'échantillon
- la date de l'analyse et le nom de l'opérateur
- la méthode utilisée (ici SOP N° Nutri-MeatFish-002-fr)
- toutes observations relatives à l'état de l'échantillon si celui-ci était ou paraissait suspect avant analyse
- les résultats (masse de la prise d'essai, tare du ballon, tare du ballon contenant les lipides après évaporation à sec des solvants, teneur en lipides totaux calculés en g/ 100 g d'échantillon)
- toutes observations relatives au déroulement de la méthode si son application venait à être problématique

11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	Responsible person	Description of change

12 ANNEXE

<table>
<tr><td></td><td><u>African Food Tradition rEvisited by Research</u>
<u>FP7 n°245025</u></td><td></td></tr>
<tr><td colspan="3">Deliverable D.1.2.3.12: SOP for biochemical and nutritional analysis for Group 2</td></tr>
<tr><td colspan="3">Procédure pour la détermination de 4 HAP dans les produits carnés fumés
(Benzo(a) Anthracène, Chrysène, Benzo(b)Fluoranthène, Benzo(a)pyrène)</td></tr>
<tr><td colspan="3">SOP : Anti-Nutri-Meatfish-001-fr</td></tr>
<tr><td colspan="2">Date : 21/06/2011</td><td>Version: 2</td></tr>
<tr><td colspan="3">Ecrit par : Joel GRABULOS

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :
• Joel GRABULOS (grabulos@cirad.fr)
• Elodie Arnaud (elodie.arnaud@cirad.fr)
•
•</td></tr>
<tr><td colspan="3">Ce document a été approuvé par :</td></tr>
</table>

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD	T. Goli, E. Arnaud, M. Rivier	21/06/2011
UAC		
CSIR		
ADIV		
UT		
UCAD		
INRA		

Table des matières

1 DOMAINE ET APPLICATION

La présente note a pour objet de décrire une méthode d'analyse de quatre hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans des produits carnés fumés.

Il s'agit de quantifier le Benzo(a)pyrène, le Chrysène, le Benzo(a)anthracène et le Benzo(b)fluorenthène.

2 REFERENCES

Protocole de préparation de l'échantillon : SOP Prep-MeatFish-001-fr

La méthode d'extraction s'inspire de la méthode décrite par P. Mottier et al (*J. Agric. Food Chem.* **2000,** *48,* 1160-1166) à ceci près que l'HPLC est la technique de détection et de quantification choisie, comme préconisé dans la norme NF EN ISO 15302 pour la détermination de la teneur en benzo[a]pyrène.

Ce protocole a été modifié par le CIRAD pour réduire les volumes de réactifs, très coûteux et polluants. Elle a été validée en interne au CIRAD et fait l'objet de validations périodiques dans le cadre du réseau interlaboratoires Fapas.

3 DEFINITIONS

Les HAP constituent une large classe de composés organiques formés de deux cycles aromatiques condensés ou plus. Ils sont surtout formés à une température supérieure à 500°C par la combustion incomplète ou la pyrolyse de matière organique, qui intervient dans un certain nombre de procédés industriels. Dans le cas du fumage, une combustion directe de biomasse, la proximité des aliments à fumer avec le foyer de combustion et une forte température de pyrolyse mènent à une forte production d'HAP.

Un certain nombre d'entre eux, tel que le benzo[a]pyrène, sont reconnus cancérigènes et mutagènes au-delà d'un seuil défini dans une Directive de l'Union Européenne, qui, pour le moment ne prend en compte que le Benzo(a)pyrène. La réglementation devrait se durcir à l'avenir en prenant en compte un groupe plus important de molécules dont les trois autres prises en compte dans le présent SOP. Il n'y a pas de limite au nombre de noyaux accolés, et le nombre d'isomères augmente considérablement avec le nombre de cycles aromatiques. De plus, ils peuvent être alkylés. Il existe donc un nombre infini de HAP, dont les propriétés sont très variables suivant leur taille et leur forme.

Le choix de doser les 4 HAP énumérés en §1 repose sur un avis du comité EFSA : *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question N° EFSA-Q-2007-136), The EFSA Journal (2008) 724, 1-114.* Dans cet article, il a été conclu que ce groupe, appelé "HAP4", est le mieux corrélé avec le risque de santé pour le consommateur en lien avec la consommation d'aliments fumés.

4 PRINCIPE

A partir d'un broyat, une étape de saponification à la soude éthanolique 1 M est réalisée dans un bain marie à 80°C sous agitation.

Une extraction liquide-liquide au cyclohexane permet de récupérer les HAP présents. La séparation par chromatographie liquide haute performance (HPLC) est réalisée sur une colonne C18 avec une détection en fluorimétrie, à des longueurs d'ondes spécifiques à chaque HAP.

L'identification est réalisée d'après le temps de rétention et la quantification est calculée au moyen d'une solution étalon.

5 REACTIFS

Tous les réactifs utilisés sont de qualité analytique ou HPLC. Les noms de marque sont donnés à titre indicatif. Tout autre réactif équivalent peut être utilisé, après avoir vérifié l'absence des HAP recherchés dans ces réactifs.

5.1 Saponification

- Solution de Potasse éthanolique 1 M
- Hydroxyde de potassium en pastilles pour analyse KOH, réf 105021 Merck.
- Ethanol absolu qualité « analyse ».

Pour 100 mL de Potasse éthanolique, pesez exactement 5,6 g de KOH, dissoudre avec 5 mL d'eau distillée et compléter avec 100 mL d'éthanol absolu.

5.2 Extraction liquide-liquide

- Cyclohexane, réf 34855 Sigma Chromasolv.

- Eau distillée (sur système de purification Rios 5 Millipore).

5.3 Détermination des HAP par HPLC

5.3.1 Phases mobiles

- Acétonitrile qualité HPLC
- Eau ultrapure obtenue par résine échangeuse d'ions à partir d'un système type MilliQ Millipore.

Pour 1 litre de phase mobile « solvant A » (Acétonitrile/Eau, 60/40), mesurer à l'éprouvette 600 mL d'acétonitrile, puis 400 mL d'eau ultrapure.

Le « solvant B » est 100% Acétonitrile

5.3.2 Solutions étalons de HAP

- ***B(a)P***, Benzo[a]pyrene 200 µg/mL dans chlorure de méthylène, Supelco réf 4-8665, ampoule 1mL.
- ***B(a)A***, Benz[a]anthracene 200 µg/mL dans chlorure de méthylène, Supelco réf 4-8651, ampoule 1mL.
- ***B(b)F***, Benzo[b]fluoranthene 200 µg/mL dans méthanol, Supelco réf 4-8637, ampoule 1mL.
- ***Ch***, Chrysene 200 µg/mL dans chlorure de méthylène, Supelco réf 4-8650, ampoule 1mL.

A partir de ces solutions étalons commerciales, préparer une solution d'un mélange de ces 4 étalons à 10 µg/mL de chaque HAP, appelé **S1**. Pour cela, prélever 250µL de ***B(a)P*** **+** 250µL de ***B(a)A*** **+** 250µL de ***B(b)F*** **+** 250µL de ***Ch*** **+** 4 mL d'acétonitrile.

A partir de la solution **S1**, préparer une solution à 200 ng/mL, appelée **S2**. Pour cela, prélever 100 µL de **S1** + 4,9 mL d'acétonitrile.

A partir de la solution **S2,** préparer la gamme étalon comme suit :

	Quantités solution **S2** (µL)	Quantités acétonitrile (µL)
S3 40 ng/mL	200	800
S4 20 ng/mL	100	900
S5 8 ng/mL	40	960
S6 4 ng/mL	20	980
S7 2 ng/mL	20	1880

6 APPAREILLAGE, CONSOMMABLE

6.1 Préparation échantillon

- Broyeur ménager à hélice, type broyeur à viande
- Pots de prélèvement en verre pouvant contenir l'échantillon broyé (environ 10 g)
- Spatule

6.2 Saponification

- Agitateur magnétique multipostes (6 ou 15 postes) en forme de plaque, adaptable sous cuve bain marie, de type Variomag Fisher Bioblock
- Cuve bain marie 15 litres surélevée.
- Thermostat à immersion type Polystat 36 Fisher Bioblock.
- Flacon en verre à fond plat de 16 mL (21 x 73 mm) avec joint caoutchouc/Téflon Réf 7857F Fisher Bioblock.
- Barreau aimanté 15x6 mm.
- Pipette automatique à volume variable 1-5 mL.
- Balance de précision 0,01 mg.

6.3 Extraction liquide-liquide

- Centrifugeuse de laboratoire acceptant un rotor pour des flacons de 16 mL (21 x 73 mm) et avec un réglage de la vitesse et du temps de centrifugation (3000 rpm, 5 min).
- Pipette Pasteur avec poire de prélèvement.
- Tube en verre de 12 mL avec bouchon.
- Poste d'évaporation sous flux d'azote. Poste composé d'un bain à sec chauffant avec un portoir pour tube type « tube hémolyse », un plateau répartiteur de gaz ou l'on positionne plusieurs aiguilles. Le tout placé sous hottes afin d'évacuer le solvant.

6.4 Détermination des HAP par HPLC

- Vials pour HPLC 2 mL avec bouchon 8 mm (compatibles avec le système HPLC du laboratoire).
- Filtre seringue type Minisart SRP4 en PTFE dia 4 mm, seuil 0,22 µm, non stérile.
- Seringue sans aiguille, en plastique avec embout pour filtre de 1 ou 2 mL.
- Pipette automatique 1 mL.
- Chaine HPLC, comme par exemple un équipement type ULTIMATE 3000 de chez DIONEX avec détecteur Fluorimétre RF 2000.

  Cet équipement doit comprendre :

  - Des réservoirs à solvant (voir 5.3.1)
  - Une pompe à gradient HPG réglé à un débit de 1mL/min et un gradient comme suit :

Temps (min)	% Solvant A	% Solvant B
0	100	0
5	100	0
40	0	100
45	0	100
50	100	0
60	100	0

  - Une colonne analytique, de caractéristique semblable à une Uptisphere 300 Å, avec des particules de 5 µm, d'une longueur de 250 mm et de diamètre 4,6 mm (Interchim).
  - Un injecteur composé d'une boucle de 10 µL (10 µL sont injectés pour la gamme étalon et les échantillons).
  - Un four à colonne pouvant maintenir une température de 30°C.
  - Un détecteur Fluorimètre capable de changer en cours de gradient de longueur d'onde. Pour la détection des 4 HAP, les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont paramétrées comme indiqué dans le tableau ci-dessous et suivi d'un « auto zéro » pour la ligne de base.

HAP	Temps (min)	λ excitation (nm)	λ émission (nm)
B(a)A	0 - 29	270	385
Ch			
B(b)F	29 - 34	270	420
B(a)P	34 - 60	381	405

- Logiciel de pilotage et de retraitement des données chromatographiques, comme par exemple « Chromeleon® ».

7 PROCÉDURE

7.1 Préparation des échantillons

Les échantillons sont préparés selon la procédure décrite dans le SOP Prep- MeatFish-001-fr. Ils peuvent être alors congelés.

7.2 Saponification

Peser environ exactement 1 g de broyat dans flacon en verre (6.2), ajouter un barreau aimanté (6.2) et 3 mL de potasse éthanolique (5.1).

Placer le tube avec son bouchon dans le bain marie à 80°C au dessus de l'emplacement de l'agitateur magnétique (6.2). La saponification dure 30 min. Sortir le tube et le laisser refroidir.

7.3 Extraction liquide-liquide

Ajouter 3 mL de cyclohexane, et replacer le tube au bain marie à 80°C sous agitation durant 5 min.

Sortir le tube et rajouter 2 mL d'eau ultrapure.

Centrifuger 5 min à 3000 rpm (6.3), récupérer dans un tube en verre le surnageant c'est-à-dire la phase organique à l'aide de la pipette Pasteur. Pour cela, prélever avec précaution la phase en laissant une portion de 1 mm de phase organique (cyclohexane + HAP) afin de ne pas récupérer de phase aqueuse.

Réaliser ensuite l'étape de nettoyage pour finir de récupérer le maximum de HAP. 2 fois de suite, ajouter 2 mL de cyclohexane dans le tube de saponification, vortexer fortement et centrifuger 5 min à 3000 rpm. Récupérer à chaque fois le surnageant comme précédemment et l'additionner aux précédents. Au final un volume compris entre 6 et 7 mL est récupéré dans le tube en verre.

Evaporer à sec le surnageant sous flux d'azote en réglant le bain sec aux environs de 40°C.

7.4 Détermination de la teneur en HAP par HPLC

Ajouter 1 mL d'acétonitrile dans l'extrait sec, vortexer énergiquement, transvaser le tout dans une seringue munie d'un filtre PTFE 0,2 µm et filtrer dans un vials HPLC (6.4).

Le dosage s'effectue par HPLC dans les conditions décrites en 6.4.

L'identification et la quantification sont réalisées à partir de la gamme étalon après l'injection des solutions **S3 à S7** (5.3.2). Les temps de rétention des composés sont relevés sur les chromatogrammes des solutions étalons sachant que l'ordre des pics est respectivement le suivant : B(a)A, Ch, B(b)F et B(a)P.

Les temps de rétention ainsi déterminés sont utilisés pour l'identification de chaque composé sur le chromatogramme de l'échantillon analysé.

8 EXPRESSION DES RESULTATS

8.1 Mode de calcul et formules

Les différentes aires des solutions étalons (S3 à S7) sont relevées pour établir une droite d'étalonnage en portant les valeurs des aires de pic obtenues en fonction de la concentration des solutions et ceci pour chaque composé.

Etablir la droite d'étalonnage sous la forme suivante :

$$C = a \, . \, A_e + b$$

Où :

a et b sont les coefficients de la droite d'étalonnage

A_e est l'aire du pic chromatographique du HAP considéré.

C est la quantité du composé de HAP en **ng/mL**

Grace à la courbe d'étalonnage, calculer la quantité de chaque composé de HAP $\mathbf{Q_{Hap}}$ en **µg/kg** pour chaque échantillon.

La quantité $\mathbf{Q_{Hap}}$ va être exprimée sous la forme suivante :

$$QHap = \frac{C \cdot V}{m}$$

Où :

$\mathbf{Q_{Hap}}$ est la teneur en µg/kg (ppb).

V est le volume en mL de reprise de l'extrait sec par l'acétonitrile.

m est la masse en g d'échantillon analysée.

8.2 Répétabilité

L'analyse sera répétée deux fois à partir du broyat homogène préparé en (6.1)

Le coefficient de variation (écart-type rapporté à la moyenne) des déterminations ne devra pas dépasser 5%.

9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

- Ne pas conserver les échantillons de produits carnés fumés au contact de matières plastiques, privilégier le verre ou le papier aluminium.
- Les vials HPLC (échantillons après extraction, gammes étalons) peuvent être conservés à – 20°C
- La limite de détection est de 2 ppb pour chaque composé de HAP.

10 RAPPORT D'ESSAI

Indiquer pour le document de suivi de l'analyse :

- Le rapport d'essai doit inclure tous les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon (références, nature).
- toutes observations relatives à l'état de l'échantillon si celui-ci était ou paraissait suspect avant analyse
- la date de l'analyse et le nom de l'opérateur
- la méthode utilisée (ici SOP N° Anti-Nutri-MeatFish-001-fr)
- les résultats obtenus
- En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	**Personne responsable**	**Description de la modification**

	**African Food Tradition rEvisited by Research** **FP7 n°245025**	

Deliverable D.1.2.3.12: SOP for biochemical and nutritional analysis for Group 2

Procédure pour le dosage des TBARS dans les produits carnés

SOP : **Anti-Nutri-Meatfish-002-fr**

Date : 04/07/2011	Version: 1

Ecrit par : Valérie SCISLOWSKI (ADIV

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Valérie SCISLOWSKI (valerie.scislowski@adiv.fr)
-
-

Ce document a été approuvé par :

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD UAC CSIR ADIV UT UCAD INRA	V. Scislowski	04/07/2011

Table des matières

1 DOMAINE ET APPLICATION

Ce protocole décrit une méthode spectrophotomètrique de mesure des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) contenus dans les produits carnés. Cet indice est très utilisé pour mesurer l'oxydation des lipides dans les produits carnés.

2 REFERENCES

Buege, J.A. and S.D. Aust, 1978. Microsomal Lipid Peroxidation. In: Methods of Enzymology, Fleischer, S. and L. Packer (Eds.). Academic Press, New York, pp: 302-310.

3 DEFINITIONS

L'indice TBARS représente la teneur en substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBA) tel que le malondialdéhyde ainsi que d'autres produits secondaires d'oxydation des lipides tels que les alkadiénals.

4 PRINCIPE

Le principe consiste à une lecture spectrophotomètrique après incubation à chaud de l'échantillon totale (sans extraction préalable des matières grasses) en présence de TBA puis extraction du chromophore .

5 REACTIFS

- Acide trichloroacétique TCA 99%
- 2,6-di-tert-butyl-4-méthylphénol BHT >99%
- Acide éthylène diamine tetraacétique EDTA 0,5 M pH8 (liquide)
- Acide thiobarbiturique (TBA) 98% (poudre)
- Malonaldehyde bis diethylacetal TEP 95% (liquide)
- Eau distillée
- Ethanol absolu 100%
- HCl 0,1N

6 APPAREILLAGE, CONSOMMABLE

- Fioles jaugées (25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL)
- Tubes à essai en verre de 20 mL à vis, avec bouchons à joint téflon
- Pipettes de 2 mL, 10 mL, P200, P1000, P5000
- Filtres plats Whatman n°1 (diam 185 mm)
- Entonnoirs en verre (diam 80 mm) à tige courte (3 cm env.)
- Balance de précision, spatule
- Broyeur ménager
- ultraTurrax (diam tête 18 mm)
- Spectrophotomètre UV/Visible + cuves polystyrène cristal à usage unique
- Centrifugeuse et tubes en polypropylène de 50 mL à fond conique
- Bain marie à 70°C

7 PROCEDURE

7.1 Préparation des solutions d'extraction

- Solution de TCA à 5% (0,3M) dans l'eau distillée. (ex : 10g TCA qsq 200 mL)
- Solution éthanolique de BHT à 1 µg/µL dans l'éthanol. (ex : 25 mg BHT qsq 25 mL)
- Solution d'EDTA à 0,1M dans l'eau distillée (ex : 10 mL EDTA 0,5M qsq 50 mL)

7.2 Préparation des solutions de dosage

- Solution de TBA à 55,5 mM à preparer extemporanément
    - Peser 809,05 mg et completer qsp 100 mL avec NaOH 0,05N
- Standard MDA
    - Solution de dilution du standard : TCA5%, BHT 0,004 µg/µL, EDTA 0,8 mM

      Dans une fiole de 200 mL, ajouter 10 g TCA 99%, 800 µL BHT à 1 µg/µL et 1600 µL EDTA 0,1M et completer qsp 200 mL avec de l'eau distillée
- Solution mère de MDA

- Préparer une solution de TEP à 1 mg/mL dans l'HCl 0,1 N (ex 57,25 µL TEP et completer qsp 50 mL avec HCl 0,1 N) Homogénéiser, transvaser dans un tube à vis, boucher le tube et incuber 5 minutes au bain marie 100°C, puis refroidir sous l'eau courante. Cette solution de TEP hydrolyse est stable 1 mois à 4°C.

7.3 Dosage des échantillons

Attention :

- ⇨ Réaliser systématiquement deux essais par échantillon.
- ⇨ Pour le traitement d'une série d'échantillons, extraire chaque échantillon séparément immédiatement après le broyage et le conserver à 4°C en attendant d'extraire les autres échantillons de la série à réaliser (mais pendant moins d'une heure maximum).
- ⇨ Préparer les échantillons avant l'analyse en suivant la procédure SOP Prep-MeatFish-001-fr permettant une parfaite homogénéisation des produits

Etapes d'extraction

1) Peser 2 g d'échantillon dans un tube à essai à centrifuger
2) Ajouter 40 µL de BHT à 1µg/µL dans l'éthanol, 80 µL d'EDTA à 0,1M et 10 mL de TCA 5%
3) Homogénéiser 2 fois 15 secondes (ultra turax à 8000 rpm)
4) Centrifuger à 3000 g pendant 3 minutes
5) Récupérer le surnageant en le filtrant sur filtre Whatman n°1 dans un tube de 10 mL. Le filtrat doit être limpide.
6) Conserver l'extrait à 4° C à l'obscurité avant dosage.

Etapes de dosage

7) Préparer le bain marie à 70°C
8) Dans un tube à essai, introduire 3 mL d'extraits (ou 3 mL de TCA pour le blanc) ajouter 3 mL de TBA à 55,5 mM. Boucher les tubes.
9) Vortexer
10) Laisser incuber 20 minutes à 70°C au bain marie
11) Laisser refroidir 30 minutes dans l'eau glacée

12) Lire les absorbances à 532 nm contre le blanc

8 EXPRESSION DES RESULTATS

8.1 Mode de calcul et formules

mg équivalent MDA / kg d'échantillon = (0,72 / 1,56) x ($A_{532\ nm}$ x $V_{solvant}$ x Vf) / PE

avec :

0,72 / 1,56 : prise en compte du coefficient d'extinction moléculaire du complexe TBA-MDA de $1{,}56.10^5$ $M^{-1}.cm^{-1}$ et du poids moléculaire du MDA de 72 $g.mol^{-1}$

$A_{532\ nm}$: Absorbance lue au spectro

$V_{solvant}$: volume de la solution de dilution TCA+BHT+EDTA en mL

Vf : volume de filtrat prélevé

PE : masse de la prise d'essai en g

8.2 Répétabilité

Deux répétitions du même échantillon est nécessaire.

9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

La peroxydation des lipides est très influencée par les conditions de température et de lumière. Pour réduire toute oxydation en cours d'analyses, les étapes du protocole doivent être réalisées le plus vite possible, en plaçant les échantillons au maximum dans des conditions d'obscurité et à des températures faibles. Si la température ambiante venait à augmenter, prévoir de maintenir les échantillons dans des bacs à glace.

10 RAPPORT D'ESSAI

Indiquer pour le document de suivi de l'analyse :

- les détails nécessaires à une identification précise de l'échantillon (références, nature).

- toutes observations relatives à l'état de l'échantillon si celui-ci était ou paraissait suspect avant analyse
- la date de l'analyse et le nom de l'opérateur
- la méthode utilisée (ici SOP N° Anti-Nutri-MeatFish-002-fr)
- les résultats obtenus
- En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	**Personne responsable**	**Description de la modification**

12 ANNEXES

<table>
<tr><td></td><td><u>African Food Tradition rEvisited by Research</u>
<u>FP7 n°245025</u></td><td></td></tr>
</table>

Deliverable D.1.2.3.12. SOP for Biochemical and nutritional analysis for Group 2

Détermination de la teneur en azote basique volatile total dans le poisson et les produits à base de poisson

SOP Number: **Anti-Nutri-MeatFish-003**

Date de création: 30/11/2010	Révision: 01, Victor Anihouvi, 12/12/2010

Ecrit par : Janvier Kindossi
Vérifié par: Victor Anihouvi

Pour plus d'information sur ce SOP, contactez :

- Victor Anihouvi (anihvic@yahoo.fr) / WP3 member UAC (Benin)

Ce document a été approuvé par :

Partenaire	Noms des personnes l'ayant approuvé	Date DD/MM/YY
CIRAD		30/12/2010
UAC	Victor Anihouvi	
CSIR		10/11/2011
ADIV	Valérie Scislowski	
UT		
UCAD		
INRA		

Table des matières

1 DOMAINE ET APPLICATION

Cette méthode est appliquée pour le dosage de l'azote basique volatile total **(**ABVT) dans les produits halieutiques

2 REFERENCES

Ababouch L.H., 1995. Assurance qualité en industrie halieutique. Manuels Scientifiques et Techniques, Ed. Actes, pp72-91.

3 DEFINITIONS

L'azote basique volatile total (ABVT) représente l'ensemble des composés basiques volatils résultant de la dégradation des protéines sous l'action des enzymes endogènes du poisson et de l'activité des microorganismes présents dans la chair du poisson.

4 PRINCIPE

Après déprotéinisation de l'échantillon à l'acide perchlorique, on procède à la distillation de l'ABVT à la vapeur, puis à sa neutralisation par l'acide chlorhydrique.

5 REACTIFS

- Solution d'acide perchlorique à 6mg/100 ml
- Solution de soude à 20 mg/ml
- Solution étalon d'acide chlorhydrique 0,05 N
- Solution d'acide borique à 3 g/litre
- Solution de phénolphtaléine à 1 g/100 ml d'éthanol à 96%
- Solution d'indicateur de Tashiro préparée en dissolvant 2 g de rouge de méthyle et 1 g de vert de bromocrésol dans 100 ml d'éthanol à 95%

- Antimousse à base de silicone

.

6. APPAREILLAGE

- Balance analytique de précision à 0,0001g
- Distillateur de Kjeldahl
- Agitateur magnétique
- Burette de 50 ml
- Broyeur à couteau

7. PROCEDURE

- Peser 10 g d'échantillon finement broyé.
- Ajouter 90 ml d'acide perchlorique à 6 mg/100 ml ; homogénéiser le mélange dans un mixeur pendant 2 mn puis filtrer
- Prélever 50 ml de filtrat dans un matras de Kjeldahl puis ajouter plusieurs gouttes de la solution de phénolphtaléine, 6, 5 ml de soude à 20 g/litre et quelques gouttes d'agent d'anti-moussant
- Introduire parallèlement, 100 ml d'acide à 3 g/100ml et 3 à 5 gouttes d'indicateur de Tashiro dans un erlenmeyer de .250 ml (le tube de sortie du distillat doit bien immerger dans la solution d'acide borique)
- Placer le matras de Kjeldahl contenant l'extrait et l'erlenmeyer contenant la solution d'acide borique dans l'appareil de distillation
- Distiller et recueillir 100 ml de distillat dans la solution acide borique au bout de 10 minutes
- Arrêter la distillation après 10 min, retirer le tube de sortie du distillat et le rincer à l'eau distillée dans l'erlenmeyer contenant le distillat
- Titrer le distillat par la solution d'acide chlorhydrique 0,05 N (le pH du virage doit être de 5,0 ± 0,1). Noter le volume Ve de l'acide sulfurique 0,05N utilisé
- Faire un essai à blanc dans les mêmes conditions

8. EXPRESSION DES RESULTATS

8.1 Méthode de calcul et formule

La teneur en ABVT de l'échantillon est égale à

ABVT (mg N/100 g) = $(V_e - V_b) \times 0,14 \times 2 \times 100/M$

V_e = volume de la solution de H_2SO_4 0,1N utilisée pour titrer l'échantillon (ml)

V_b= volume de la solution de H_2SO_4 0,1N utilisée pour titrer le blanc (ml).

M = poids de l'échantillon

8.2 Répétabilité

L'analyse doit être effectuée en double; elle est jugée correcte si la différence entre deux déterminations obtenues sur le même échantillon ne dépasse pas 2 mg N/100g

9. POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

- Le tube de sortie du distillat doit bien immerger dans la solution d'acide borique à 2% pour éviter des pertes d'ions d'ammonium
- Il faut impérativement utiliser une solution standard de H_2SO_4 pour la titration

10. RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer :

- le nom de l'échantillon en précisant sa nomenclature et le type d'échantillon
- la date de l'analyse et le nom de l'opérateur
- la méthode utilisée (ici SOP N° Anti-Nutri-MeatFish-003-fr)
- les résultats obtenus.

- En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.

11. ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	**Personne responsable**	**Description de la modification**

	**African Food Tradition rEvisited by Research** **FP7 n°245025**	

Deliverable D.1.2.3.12. SOP for biochemical and nutritional analysis for Group 2

Procédure pour la détermination des amines biogènes (histamine, cadaverine, putrescine) dans le poisson et les produits à base de poisson

SOP Number: **Anti-Nutri-MeatFish-004-fr**

Date of creation: 30/11/2010	Revision: 1, Anihouvi Victor, 17/10/2011

Written by : Opportune Akpo/ Janvier Kindossi
Revision 1: Victor Anihouvi

For information on this SOP please contact :

- Victor Anihouvi (anihvic@yahoo.fr)/ WP3 member – UAC (Bénin)

This document has been approved by :

Partner	Name of the person who approved	Date DD/MM/YY
CIRAD		
UAC	Victor Anihouvi, Joseph Hounhouigan	30/11/2010
CSIR		
ADIV	Valérie Scislowski	05/10/2011
UT		
UCAD		
INRA		

Table des matières

1 DOMAINE ET APPLICATION

Cette méthode de dosage des amines biogènes est applicable à tous les produits de la pêche quel que soit leur mode de présentation ou de préparation. Cette méthode de chromatographie liquide haute performance (HPLC) est retenue dans le règlement communautaire (2073/2005) de l'union européenne.

2 REFERENCES

-Ababouch L.H. Assurance de la qualité en industries halieutiques, manuels scientifiques et techniques de (pages 104-106) Actes Editions, Rabat, 1995 ISBN : 9981-801-12-7
- ProStar 220/230/240 Solvent Delivery Module, Operation manual (Varian Analytical Instruments 2700 Mitchell Drive Walnut Creek, CA 94598-1675/USA)
- ProStar 363 Fluorescence detector, Operation manual (Varian Analytical Instruments 2700 Mitchell Drive Walnut Creek, CA 94598-1675/USA)

3 DEFINITIONS

Les amines biogènes dans les aliments sont produites par la décarboxylation microbienne des acides aminés. Les amines biogènes correspondent aux amines non volatiles. Les plus étudiées sont au nombre de 7 (amines aliphatiques : putrescine, cadaverine, spermidine, spermine ; amines aromatiques : histamine, tryptamine, tyramine) très important dans les aliments particulièrement dans les poissons et les produits de poissons, montrées comme source potentiel de toxicité histaminique. L'histamine résulte de la décarboxylation de la L-histidine libre par une enzyme d'origine principalement bactérienne mais aussi tissulaire. Après la mort du poisson et dans certaines conditions de stockage, notamment à partir de 2-5°C, les bactéries produisant l'histidine décarboxylase peuvent se multiplier conduisant à la formation d'histamine. Cette formation peut être parfois très rapide à partir de 10°C.

4 PRINCIPE

Comme toutes les chromatographies, cette méthode vise à séparer les constituants d'un mélange et repose sur l'utilisation d'une phase mobile et d'une phase stationnaire. La HPLC repose sur la circulation d'un fluide (phase mobile) dans une colonne (phase stationnaire). Après extraction des amines biogènes (histamine, cadaverine, putrescine) par une solution d'acide trichloracétique, on procède à leur dérivation par l'O-phtalaldéhyde (OPA) et on sépare par chromatographie liquide à phase inversée en utilisant l'acétonitrile et le Sodium dihydrogen ortho-phosphate comme phase mobile. Le dosage de l'histamine se fait par détecteur à fluorescence de HPLC.

5 REACTIFS

- Sodium dihydrogène ortho-phosphate $NaH_2PO_4 . H_2O$(2,5 mM), 0,39 g par litre d'eau distillée
- Acide trichloroacétique (ATC) à 10% en pesant 10 g dans 100 ml d'eau distillée
- Solution mère d'histamine à 1g/l en pesant 0,1656 g de chlorhydrate d'histamine dans 100 ml de solution d'acide trichloracétique à 10%.
- Solutions étalon (2) préparées comme suit :
  - Etalon de 0,005 g/ml (5mg/kg = 5ppm) :0,5ml de la solution mère dans 100 ml de ATC 10 %
  - Etalon de 0,010 g/ml (10 mg/kg = 10 ppm) :1ml de la solution mère dans 100 ml de ATC 10%
- Solution d'Ophtalaldehyne (OPA) en pesant 1 g dans 100 ml de méthanol
- Solution de NaOH (1N), dissoudre 4 g dans 100 ml d'eau distillée
- Solution de HCl (3N) en prélevant 25 ml d'une solution d'HCl 37 % à (12N) dans 100 ml d'eau distillée

6 APPAREILLAGE

- Chromatographe en phase liquide à haute performance avec détection détecteur à fluorescence
- Une colonne Lichospher 100 C18 (4,6 x 150 mm) 5 µm
- Un hachoir à viande

- Un mixeur à grande vitesse (entre 8000 et 45000 tours/min)
- Un système de filtration rapide avec des filtres de diamètre 150 mm
- Des membranes filtrantes de 0,45 µm de porosité ou papier filtre Whatman No 1
- Papier aluminium
- Micropipette de 50 à 5000 µL avec des cônes correspondants
- Une seringue d'injection de 50 µL
- Un chronomètre
- Entonnoir en verre (un par échantillon)
- Fiole de 10 à 1000mL
- Bécher de 50mL et de 500mL
- Tubes à essai de 10 mL (d=10mm) (un par étalon et par échantillon)
- Récipient pour stockage des échantillons broyés

7 PROCEDURE

Préparation des échantillons (Extraction)

- Hacher un échantillon représentatif de la chair, environ 100g, prélevée à trois (3) endroits différents du poisson
- Prélever 50g de la chair broyée dans un grand bécher
- Ajouter 100 mL d'acide trichloracétique (ATC) à 10%
- Mélanger avec un mixeur pendant 2 mn
- Filtrer avec papier filtre Whatman No 1

NB. Garder le filtrat dans un flacon en plastique au réfrigérateur pour la détermination

Mise en condition de l'appareil (HPLC)

Pompe HPLC

- Une pression maximale de 400 atm et minimale de 6 atm
- Un débit de 1 mL/minute de détermination
- La durée de l'opération est de 10 mn
- Le volume à injecter 20 µL (boucle d'injection 20 µL)

Phase mobile :

- La solution (A) d'Acétonitrile (40%)

- La solution (B) de Sodium dihydrogen orthophosphate $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ (2,5mM) (60%)

<u>Détecteur de fluorescence</u>

- La détection est faite au fluorimètre de type 0800 (1 volt)
- La longueur d'onde d'excitation est à 360 nm
- La longueur d'onde d'émission est à 450 nm

<u>Dérivation de la pré-colonne</u>

- Protéger les tubes à utiliser de la lumière du jour avec de papier aluminium et les annoter
- Prélever exactement 130 µl de l'étalon ou de la solution échantillon à analyser dans un tube
- Ajouter 1870 µl d'eau distillée
- Ajouter 400µl de NaOH (1N) et bien mélanger avec vortex
- Ajouter ensuite 100 µl de l'OPA et bien mélanger aussi
- Attendre 4 mn de réaction
- Stopper la réaction en ajoutant 200 µl d'HCl (3N) et bien homogénéiser au vortex
- Injecter 20 µl de cette solution à HPLC pour le dosage
- Faire un blanc en remplaçant la solution de l'échantillon ou les solutions standard par la solution ATC
- Veiller à la pression autour de 150 atm et le temps de détection autour de 8,9mn

8 EXPRESSION DES RÉSULTATS

8.1 Méthode de calcul et formule

Soit W (mg/kg) la teneur en histamine

$$W\ (mg/kg) = \frac{((C\times(D-B))}{(A-B)} \times \frac{2700}{130} \times 10 = \frac{((C\times(D-B))}{(A-B)} \times \frac{27}{13}$$

A= surface balayée par le pic (Area) de l'étalon

B= surface balayée par le pic (Area) du blanc

D=surface balayée par le pic (Area) de l'échantillon

C= concentration de l'étalon utilisé en mg/l

$\frac{2700}{130} = \frac{27}{13}$ = facteur de dilution

10= pour amener de mg/100g en mg/kg

La formule finale de calcul de dosage de l'histamine est :

W (mg/kg ou mg/l) = $\frac{((C\times(D-B))}{(A-B)} \times \frac{27}{13}$

8.2 Répétabilité

La différence absolue entre deux résultats individuels indépendants, obtenus à l'aide de la même méthode sur un matériau identique soumis à l'essai dans le même laboratoire, par le même opérateur utilisant le même appareillage et dans l'intervalle de temps le plus court, ne dépassera pas la valeur de répétabilité r dans plus de 5 % des cas.

9 POINTS CRITIQUES ET NOTE SUR LA PROCEDURE

- Vérifier la pureté des réactifs utilisés

- Effectuer régulièrement des essais d'étanchéité de tous les conduits d'alimentation

- Ne jamais déconnecter un conduit de solvant ou une vanne sous pression .Arrêter la pompe et laisser la pression aller à zéro

- Renouveler une fois le mois la solution mère des étalons de même que les standards et l'OPA par semaine

- Vérifier périodiquement la répétabilité, la reproductibilité de même que le temps de détection par les standards

- Le complexe OPA histamine donne un pic qui apparaît au bout de 6,416 minutes avec une limite de répétabilité de 0,04 pour l'histamine. Le domaine de linéarité de cette méthode est compris entre 10^8 et 15 ppm à l'injection. La limite inférieure de détection est de 0.01 pg par

20 µL injectés. La reproductibilité est de ± 5%. Le taux de récupération est de 94%. Le complexe OPA histamine est stable pendant 24 heures.

10 RAPPORT D'ESSAI

Le rapport d'essai doit indiquer :

- le nom de l'échantillon en précisant sa nomenclature et le type d'échantillon
- la date de l'analyse et le nom de l'opérateur
- la méthode utilisée (ici SOP N° Anti-Nutri-MeatFish-004-fr). En outre seront détaillés toute condition opératoire non indiquée dans le SOP, ou optionnelle, et les circonstances particulières qui auraient pu affecter les résultats.
- le résultat avec son unité d'expression (en mentionnant les valeurs des répétitions et la moyenne)
- toutes observations relatives à l'état de l'échantillon si celui-ci était ou paraissait suspect avant analyse
- toutes observations relatives au déroulement de la méthode si son application venait à être problématique

11 ENREGISTREMENT DES REVISIONS

Date	**person responsible**	**Description des modifications**

<table>
<tr><td></td><td colspan="2"><u>African Food Tradition rEvisited by Research</u>
<u>FP7 n°245025</u></td><td>
</td></tr>
<tr><td colspan="4">Deliverable 1.2.3.9: SOP for Chemical analysis for Group 2</td></tr>
<tr><td colspan="4">Procédure pour la préparation des échantillons de produits carnés (viandes et poissons) pour les analyses physicochimiques</td></tr>
<tr><td colspan="4">SOP : Prep-MeatFish-001-fr</td></tr>
<tr><td colspan="2">Date : 10/05/2011</td><td colspan="2">Version :</td></tr>
<tr><td colspan="4">Ecrit par : Elodie ARNAUD

Pour plus d’informations sur ce SOP, contactez :
• Elodie ARNAUD (elodie.arnaud@cirad.fr)
• Julien RICCI (julien.ricci@cirad.fr)
• Thierry GOLI (thierry.goli@cirad.fr)</td></tr>
<tr><td colspan="4">Ce document a été approuvé par :</td></tr>
<tr><td>Partenaire</td><td colspan="2">Noms des personnes l’ayant approuvé</td><td>Date

DD/MM/YY</td></tr>
<tr><td>CIRAD

UAC

CSIR

ADIV

UT

UCAD

INRA</td><td colspan="2">Julien RICCI

Valérie Scislowski</td><td>

12 /09/2011</td></tr>
</table>

Table des matières

1 DOMAINE ET APPLICATION

Cette procédure décrit le protocole de préparation des échantillons de produits carnés (viandes et poissons) pour les analyses physico chimiques.

2 RÉFÉRENCES

Norme AFNOR NF V04-416. Décembre 1999. Viandes et produits à base de viande - Préparation de l'échantillon en vue de l'analyse de composition

3 DEFINITIONS

4 PRINCIPE

Obtention par broyage de 200g de viande afin d'obtenir une préparation représentative et la plus homogène possible.

5 RÉACTIFS

6 APPAREILLAGE ET CONSOMMABLES

- Planche à découper
- Couteaux
- Broyeur type Grindomix ou robot ménager
- Pots
- Spatules
- Réfrigérateur (0-4°C)

- Congélateur -20°C

7 PROCÉDURE

7.1 Préparation de l'échantillon

Avant le broyage, amener l'échantillon à une température proche de 0°C. Pour cela, les échantillons sont stockés au frigo ou les produits sont décongelés au frigo une nuit avant le jour d'analyse.

Oter les parties non consommables (tête et arêtes des poissons).

Découper au moins 200g de produit au couteau en petits dès.

7.2 Broyage

Broyer les dés d'échantillon. Adapter la durée du broyage à la nature du produit afin que le produit broyé se présente autant que possible sous une forme homogène.

Dans le cas de broyages successifs dans le même récipient, s'assurer que celui est propre et sec.

7.3 Conservation des échantillons

A l'aide d'une spatule, mettre le broyat dans un/des pot(s) identifié(s).

Conserver le broyat jusqu'au moment de l'analyse au frigo pour la mesure de la teneur en eau et de l'activité en eau et, pour les autres analyses, au frigo si les analyses vont être réalisées rapidement (- de 24h) ou au congélateur -20°C après conditionnement en emballage étanche sous vide.

8 EXPRESSION DES RESULTATS

8.1 Méthode de calcul et formules

8.2 Répétabilité

9 POINTS CRITIQUES ET NOTES SUR LA PROCEDURE

10 RAPPORT D'ESSAI

11 ENREGISTREMENT DES RÉVISIONS

Date	Personne responsable	Description de la modification

12 ANNEXE